

3. Material

3.1 Geräte

2D-Gelapparatur	Amersham Pharmacia (Freiburg)
ALF-Sequenzier	Apple (München)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Computer	Apple (München), Microsoft
Elektroporationsgerät	BTX Inc.(San Diego)
FACScan	Becton Dickinson(Heidelberg)
FACS Vantage cell sorter	Becton Dickinson (Heidelberg)
Geltrockner	Bio-Rad (München)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Küvetten	Bio-Rad (München)
Lumi-Analyst	Roche Diagnostics (Mannheim)
Massenspektrometer	Finnigan LaserMAT (Ringoos, USA)
Mikroskop	Leitz (Wetzlar)
Proteingelelektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
Sterilabzug	Concept (Heidelberg)
Zentrifugen	Minifuge, Biofuge 13 Heraeus (Hanau) RC-5B Superspeed Sorvall (Hanau) L8-55M Beckmann (München)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	R. Langenbrinck (Emmendingen)
Einfrierröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Filter Pore 0,45µm	Millipore (Eschborn)
Gewebekulturflaschen	Greiner (Nürtingen)
Glassplatten	Bio-Rad (München)
Handschuhe	Safeskin (Neufahrn)

Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen)
Petrischalen	Greiner (Nürtingen)
Pipettenspitzen	Gilson (Langenfeld)
Plastikröhrchen	Greiner (Nürtingen)
Plastikschalen (96 Loch)	Greiner (Nürtingen)
PVDF Membran	Millipore (Eschborn)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia (Freiburg)
UltrafreeMC Filter 30 kD	Millipore (Eschborn)
Western Blot Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)

3.3 Chemikalien

6-Aminocaprinsäure	Riedel-de Haen (Seelze)
³⁵ S-Pro-Mix	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Acrylamid-Fertiglösung	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose für Elektrophorese	GibcoBRL (Eggenstein)
Amphotericin	ICN (Eschwege)
Ampicilin	Sigma (Taufkirchen)
APS	Merck (Darmstadt)
Azeton	Merck (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
BSA	Serva (Heidelberg)
Brefeldin A	Sigma (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue	Bio-Rad (München)
Concanavalin A-Sepharose	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Diamid	Sigma (Taufkirchen)
Digitonin (wasserlöslich)	Riedel-de Haen (Seelze)
DMEM	GibcoBRL (Eggenstein)

DMSO	Merck (Darmstadt)
DTT	Sigma (Taufkirchen)
ECL-Lösung	KMF/Pierce (St. Augustin)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Riedl-de Haen (Seelze)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylalkohol	Merck (Darmstadt)
FCS	Biochrom (Berlin)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Genitacin (G418)	Sigma (Taufkirchen)
Glutamin	Gibco-BRL (Freiburg)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Glykogen	Renner (Darmstadt)
GSH	Sigma (Taufkirchen)
GSSG	Sigma (Taufkirchen)
HEPES	Sigma (Taufkirchen)
Interferon- γ	Roche Diagnostics (Mannheim)
Iodacetamid	Sigma (Taufkirchen)
Isopropanol	Riedel-de-Haen (Seelze)
Kanamycin	Sigma (Taufkirchen)
Lactacystin	Calbiochem (Schwalbach)
LLnL	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	Riedl-de Haen (Seelze)
Natriumacetat pH 5,2	Merck (Darmstadt)
Nitrilotriessigsäure	Sigma (Taufkirchen)
Natronlauge	Merck (Darmstadt)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom KG (Berlin)
Nonidet-P40	Sigma (Taufkirchen)
Orthophenylendiamin (OPD)	Sigma (Taufkirchen)
Pepstatin	Roche Diagnostics (Mannheim)
PBS	GibcoBRL (Eggenstein)
Proteaseinhibitortabletten	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein A-Sepharose	Amersham Pharmacia (Freiburg)

- ΔN19** Ligation von Ppu (#61) (T4-Polymerase behandelt) auf MslI (#244) im hTpn-Insert (Zählung der Nukleotide beginnt mit ATG im offenen Leseraster)
- ΔN44** Ligation von SacII (#64) (T4-Polymerase behandelt) auf SacI (#191) (T4-Polymerase behandelt) im hTpn-Insert
- ΔIlg** (=262-377) Ligation von Eco91I (#843) auf Eco91I (#1191) im hTpn-Insert
- ΔC49** Ligation von Eco91I (T4-Polymerase behandelt) im hTpn-Insert auf SpeI (#258) in pCR2.1 (ergibt Stop-Kodon im Leseraster)
- ΔC53_{KDEL}** Ligation eines Fragments Eco91I (#295 pCR2.1) (T4-Polymerase behandelt) - Eco47III (#1185) im hTpn-Insert in ein pSP72-abgeleitetes Plasmid, das die ER-Retentionssequenz NSKDEL enthält.
- ΔC33** Ligation von StuI (#1244) im hTpn-Insert mit XbaI (#328) in pCR2.1 (ergibt Stop-Kodon im Leseraster)
- K408V** Insertion eines Doppelstrangoligonukleotids, das für die Mutation K₄₀₈/AAG -> V₄₀₈/GTG in der hTpn-Sequenz kodiert, zwischen StuI (#1244) und AclI (1304) im hTpn-Insert
- L410F** Insertion eines Doppelstrangoligonukleotids, das für die Mutation L₄₁₀/CTG -> F₄₁₀/TTC in der hTpn-Sequenz kodiert, zwischen StuI (#1244) und AclI (1304) im hTpn-Insert
- m₁₄₉hTpn** Insertion eines XhoI (Marathon-Adapter) - XhoI (mTpn #512, Zählung der Nukleotide beginnt mit ATG) Fragmentes aus pBS/mTpn zwischen XhoI (pCR2.1 #316) und XhoI (hTpn-Insert #503)

Alle cDNA-Konstrukte wurden in die Multiklonierungssequenz des episomalen Expressionsvektors pREP4 subkloniert.

3.5 Proteine

3.5.1 Enzyme

Calf alkaline intestinal phosphatase	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)
Endoglykosidase H	Roche Diagnostics (Mannheim)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
SP6-Polymerase	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)
T3-Polymerase	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)
T4-Ligase	Roche Diagnostics (Mannheim)
T4-Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
T7-Polymerase	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)

3.5.2 Antikörper

Primärantikörper

TAP

hTAP1 (Maus, monoklonal)	148.3 (van Endert et al., 1994)
hTAP1 (Kaninchen, polyklonal)	anti-TAP1 (Nijenhuis und Hämmerling, 1996; freundlicherweise überlassen von Dr. J. Neefjes, NKI, Amsterdam)
mTAP2 (Kaninchen)	anti-mTAP2 (freundlicherweise überlassen von Dr. G. Moldenhauer, DKFZ)

ER-Proteine

Calnexin (Kaninchen, polyklonal)	SPA-865 (Biomol)
Calretikulin (Kaninchen, polyklonal)	SPA-600 (Biomol)
Calretikulin (Maus, monoklonal)	SPA-601 (Biomol)
ER60 (Kaninchen, polyklonal)	M. Kito (Kyoto), SPA-700 (Biomol)
ER60 (Maus, monoklonal)	SPA-725 (Biomol)

hTapasin (Kaninchen, polyklonal)	anti-hTpn AS 2-20 = "PAV" (Garbi et al., 2000)
hTapasin (Kaninchen, polyklonal)	anti-hTpn AS 418-428 = "STC" (freundlicherweise überlassen von Dr. G. Moldenhauer, DKFZ)
mTapasin (Kaninchen, polyklonal)	anti-mTpn (Yu et al. 1999) (freundlicherweise überlassen von Dr. T. Hansen, St. Louis, WO, USA)

MHC-Klasse I

Maus

H-2K ^b (Maus, monoklonal)	K10-56 (Ortiz-Navarrete & Hämmerling, 1991), Y3 (Jones und Janeway, 1981)
H-2K ^b (Kaninchen, polyklonal)	anti-P8 (Neefjes et al., 1992)

Mensch

HLA-B8 (Bw6):	SFR8-B6 (Radka et al., 1982) 2BC4 (Ziegler et al., 1982) T384-25 (Saxon Europe, UK) T126-39 (Saxon Europe, UK)
HLA-B44 (Bw4):	TÜ109 (Müller et al., 1985) TT4-A20 (Tahara et al., 1990) T116-5-28 (Saxon Europe, UK)
β_2 -Mikroglobulin	BBM.1 (Brodsky et al., 1979)
freie Schwereketten (nicht HLA-A)	HC-10 (Stam et al., 1986)
freie Schwereketten HLA-A	HC-A2 (Stam et al., 1990)
konformationsabhängig	W6/32 (Barnstable et al., 1978)

Sekundärantikörper

Western Blot (Peroxidase gekoppelt)

Ziege anti-Maus IgG	Dianova (Hamburg)
<i>(Fcγ Fragment spezifisch, min. kreuzreakt. mit humanem, bovinem, Pferdeserum)</i>	

Ziege anti-Kaninchen IgG
(H+L, min. kreuzreakt. zu humanem Serum) Dianova (Hamburg)

FACS

Ziege anti-Maus IgG FITC gekoppelt
(H+L, min. kreuzreakt. zu humanem Serum) Dianova (Hamburg)

Ziege anti-Ratte IgG FITC gekoppelt
(H+L, min. kreuzreakt. zu humanem Serum) Dianova (Hamburg)

3.5.3 Peptide

HLA-A11-bindendes Kontrollpeptid

ASYDKAKLK (Zhang et al., 1993)

HLA-B*4402 bindene Peptide

AEDKENYKKF = *AED* (Hsp90 AS 427-436) Fleischhauer et al., 1994

VEITPYKPTW = *VEI* (EBNA-6 AS 657-666) Peh et al., 1999

Peptide für Kaninchenserum

PAVIECWVVEDASGKGLAKC = *PAV* (hTapasin AS 2-20 + Cys)

CSTCKDSKKKAE = *STC* (Cys+hTapasin AS 418-428)

3.6 Kits

Pharmacia DNA-Sequenzierungskit

Qiagen Mini-Prep Kit

Qiagen Maxi-Prep Kit

Qiagen Gelelution Kit

Qiagen SuperFect Transfection Kit

3.7 Puffer und Lösungen

3.7.1 Molekularbiologie

DNA/RNA-Isolierung

Chloroform-Lösung

24	ml	Chloroform
1	ml	Isoamylalkohol

Phenol-Lösung

25	ml	Phenol
24	ml	Chloroform
1	ml	Ethylalkohol

Restriktionsverdau

CIP-Puffer (pH 9,0)

50	mM	Tris/HCl
1	mM	MgCl ₂
0,1	mM	ZnCl ₂
1	mM	Spermidin

TE-Puffer (pH 7,4)

10	mM	Tris/HCl
5	mM	EDTA

5x Ligasepuffer (pH 7,6)

5	mM	Tris/HCl
5	mM	DTT
10	mM	MgCl ₂
10	mM	Spermidin
10	µg/ml	BSA
0,5	mM	ATP

T4-Polymerase-Puffer

50	mM	Tris/HCl (pH 7,2)
10	mM	MgCl ₂
0,1	mM	Dithiothreitol (DTT)
50	µg/ml	BSA
33	mM	Tris-Acetat pH 7,8
66	mM	Kaliumacetat
10	mM	MgCl ₂

Restriktionspuffer

New England Biolabs (Schwalbach), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)

dNTPs

dATP/dCTP/dGTP/dTTP-Mischung je 0,5 mM in Wasser

DNA-Gelelektrophorese

6x DNA-Probenpuffer

50	%	Glycin
0,20	%	SDS
0,05	%	Bromphenolblau
1	mM	EDTA

50x TAE Puffer (pH 8,0)

50	mM	EDTA
2	M	Tris-HAc

DNA-Sequenzierung

Sequenzierlösung

240	g	Harnstoff
75	ml	40% Acrylamid
75	ml	10x TBE

ad 500 ml H₂O

3.7.2 Proteinchemie

Allgemeine Puffer

1x TBS (pH 7,4)

150	mM	Tris
50	mM	NaCl
5	mM	MgCl ₂

Lysepuffer (pH 7,4)

1	x	TBS
1	%	Detergenz (v/v)
1 Proteaseinhibitortablette / 15ml		

10x Endoglykosidase H-Puffer (pH 5,5)

500	mM	Natriumacetat
-----	----	---------------

Coomassie-Blau

0,1	%	Coomassie R Brilliant Blue
50	%	MeOH
7	%	Essigsäure

Mikrosomenpuffer (pH 7,5)

250	mM	Saccharose
50	mM	TEA
50	mM	Kaliumacetat
6	mM	Magnesiumacetat
1	mM	EDTA
1	mM	DTT
500	µM	PMSF

CNBr-aktivierte Sepharose-BeadsCarbonatpuffer (pH8,0)

100	mM	NaHCO ₃
500	mM	NaCl

Salzsäure (pH3,0)

10	ml	Wasser
1	µl	37% HCl

Waschpuffer I (pH 4,0)

100	mM	Natriumacetat
500	mM	Natriumchlorid

Waschpuffer II (pH 8,0)

100	mM	Tris/HCl
500	mM	Natriumchlorid

Blockingpuffer (pH 8,0)

100	mM	Tris/HCl
-----	----	----------

Peptid-Isolierung für MALDILyse-Puffer (pH 7,5)

20	mM	Tris/HCl
5	mM	MgCl ₂
1	%	NP40

NaP-Puffer (pH 8,0)

50	mM	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
50	mM	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O

Waschpuffer I (pH 8,0)

NaP-Puffer		
0,5	%	Zwittergent 12

Waschpuffer II (pH 8,0)

NaP-Puffer		
0,1	%	Zwittergent 12

Elutionspuffer (pH 11,0)

NaP-Puffer pH8

0,1 % Zwittergent 12

mit NaOH auf pH11

Matrix

1 % TFA

50 % Acetonitril mit
1,4-Dihydroxy-benzoesäure gesättigt**Proteingele**6x SDS-PAGE Probenpuffer (pH 6,9)

150 mM Tris/HCl

12 % SDS

30 % Glyzerin

0,015 % Bromphenolblau

reduzierend:

5 % β -Mercaptoethanol10x SDS-PAGE Laufpuffer

250 mM Tris

190 mM Glycin

1 % SDS (w/v)

SDS-Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Tris / HCl

0,4 % SDS (w/v)

SDS-Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 M Tris / HCl

0,4 % SDS

Fixierer

120 ml Essigsäure

500 ml Methanol

380 ml Wasser

Western BlottingAnodenpuffer (pH 10,4)

48,4 g Tris/HCl

1000 ml Wasser

Kathodenpuffer (pH 9,4)

6,05 g Tris/HCl

10,48g 6-Aminocapronsäure

1000ml Wasser

PBS/Tween

0,05 % Tween20
in PBS

Milchpulver

1 % Milchpulver
in PBS/Tween

Antikörperverdünnung

1 % BSA in PBS/Tween

ELISACarbonatpuffer (pH 9,6)

50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$

Substratpuffer

100 mM KH_2PO_4

Blockpuffer

0,2 % Gelatine
0,1 % Natriumazid in PBS

3.7.3 Zellbiologie**Zellkultur** β -Mercaptoethanol-Lösung

0,1 % β -Mercaptoethanol in D-PBS

D-PBS (pH 7,3)

Gibco (angesetzt)

Glukose

20 % in D-PBS

DMEM Transfektionsmedium

DMEM ohne Zusätze bis auf
20 mM HEPES

Geneticin

100 mg/ml in D-PBS

Einfriermedium

10 %
50 %
40 %

DMSO
FCS
RPMI

Trypsin

0,4 %
0,75 mM

Trypsin
EDTA in PBS

Minusmedium

3 %

dialysiertes FCS
in RPMI ohne Methionin/Cystein

Zusätze für 500 ml RPMI 1640 oder 500 ml DMEM

50 ml FCS (hitzeinaktiviert bei 56 ° C 30 min)
5 ml Glutamin (200mM)
5 ml HEPES (1M)
5 ml Glukose (20%)
300 µl β-Mercaptoethanol-Lösung
vorbeugend:
1 ml Amphotericin (250 µg/ml)
500 µl Gentamicin (50 mg/ml)

zur Selektion:

0,3 mg/ml Hygromycin für LCL 721.220.B8

0,3 mg/ml Hygromycin und
0,5 mg/ml Genetitin für LCL 721.220.B44

FACS-FärbungenFACS-Medium

3 %
0,05 %

FCS
Natriumazid in D-PBS

3.8 Zelllinien

B-LCL721.220 (=220)	humane B-lymphoblastoide -Zelllinie (B-LCL); aus gamma-Bestrahlung von LCL 721 hervorgegangen; EBV-transformiert (Shimizu et al., 1989); exprimiert kein Tapasinprotein voller Länge, jedoch mRNA für eine um 20 Aminosäuren verkürzte Tapasin-Spleißvariante wird gefunden (Copeman et al., 1998) (freundlicherweise überlassen von Dr. R. DeMars, Madison, WI, USA)
.220.B44	Transfektante von 721.220 mit HLA-B*4402 im Vektor pRSV.5neo (Peh et al., 1998; freundlicherweise überlassen von Dr. J. McCluskey, Melbourne, AUS)
.220.B8	Transfektante von LCL 721.220 mit HLA-B8 im Vektor pHPT-32 (Greenwood et al., 1994; freundlicherweise überlassen von Dr. T. Elliott, Oxford, GB)
T2	humane lymphatische Zelllinie; stammt vom T-B-Zell Hybrid T1 (aus 721.174 und CEM); Deletion in der MHC II-Region, die die Gene für TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 betrifft (Salter et al., 1985)
T2.rTAP2	Transfektante von T2 mit rTAP1 und rTAP2 ^a (Momburg et al., 1992)

3.9 Mausstämme

Tapasin ^{-/-} (H-2 ^b):	Garbi et al., 2000
129 (H-2 ^b)	